

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/82, 15/54, 15/55, A01H 5/00</b>		<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/07221</b>
			<b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 27. Februar 1997 (27.02.97)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP96/03514		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
<b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 8. August 1996 (08.08.96)		<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
<b>(30) Prioritätsdaten:</b> 195 29 696.6 11. August 1995 (11.08.95) DE			
<b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> RIESMEIER, Jörg [DE/DE]; Ludwigsfelderstrasse 18, D-14165 Berlin (DE).			
<b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> TRETHERWEY, Richard [GB/DE]; Altes Rad 29, D-14469 Eiche (DE). WILLMITZER, Lothar [DE/DE]; Am Kleinen Wannsee 34, D-14109 Berlin (DE).			
<b>(74) Anwalt:</b> VOSSIUS & PARTNER; Postfach 86 07 67, D-81634 München (DE).			
<b>(54) Title:</b> TRANSGENIC PLANT CELLS AND PLANTS HAVING AN INCREASED GLYCOLYSIS RATE			
<b>(54) Bezeichnung:</b> TRANSGENE PFLANZENZELLEN UND PFLANZEN MIT GESTEIGERTER GLYKOLYSERATE			
<b>(57) Abstract</b> <p>The invention concerns transgenic plant cells and plants having an increased glycolysis rate. The glycolysis rate is increased by the introduction and expression in plant cells of a DNA sequence which codes for an invertase, preferably a deregulated or unregulated invertase, and a DNA sequence which codes for a hexokinase, preferably a deregulated or unregulated hexokinase. The invention further concerns processes and recombinant DNA molecules for producing plant cells and plants having an increased glycolysis rate.</p>			
<b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Es werden transgene Pflanzenzellen und Pflanzen mit einer gesteigerten Glykolyserate beschrieben. Die Steigerung der Glykolyserate wird erreicht durch die Einführung und Expression einer DNA-Sequenz, die eine Invertase, vorzugsweise eine deregulierte oder unregulierte Invertase, codiert, sowie einer DNA-Sequenz, die eine Hexokinase codiert, vorzugsweise eine deregulierte oder unregulierte Hexokinase, in pflanzlichen Zellen. Ferner werden Verfahren und rekombinante DNA-Moleküle zur Herstellung von Pflanzenzellen und Pflanzen mit gesteigelter Glykolyserate beschrieben.</p>			

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LU	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LV	Lettland	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	MC	Monaco	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MD	Republik Moldau	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
EE	Estland	ML	Mali	UG	Uganda
ES	Spanien	MN	Mongolei	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MR	Mauretanien	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MW	Malawi	VN	Vietnam
GA	Gabon				

## Transgene Pflanzenzellen und Pflanzen mit gesteigerter Glykolyserate

Die vorliegende Erfindung betrifft transgene Pflanzenzellen und Pflanzen mit einer im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzen gesteigerten Glykolyserate. Die Steigerung der Glykolyserate wird erreicht durch die Einführung und Expression einer DNA-Sequenz, die eine cytosolische Invertase, vorzugsweise eine deregulierte oder unregulierte Invertase codiert, sowie einer DNA-Sequenz, die eine cytosolische Hexokinase, vorzugsweise eine deregulierte oder unregulierte Hexokinase codiert, in pflanzlichen Zellen. Die Erfindung betrifft ebenfalls Verfahren und rekombinante DNA-Moleküle zur Herstellung von transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen, mit gesteigerter Glykolyserate, sowie die Verwendung von DNA-Sequenzen, die Proteine mit der enzymatischen Aktivität einer Invertase oder Proteine mit der enzymatischen Aktivität einer Hexokinase codieren, zur Herstellung von Pflanzen, die eine gesteigerte Glykolyserate aufweisen.

Bedingt durch den kontinuierlich steigenden Bedarf an Lebensmitteln, der aus der ständig wachsenden Weltbevölkerung resultiert, ist eine der Aufgaben der biotechnologischen Forschung, sich um eine Steigerung des Ertrags von Nutzpflanzen zu bemühen. Eine Möglichkeit, dies zu erreichen, besteht in der gezielten gentechnischen Veränderung des Metabolismus von Pflanzen. Ziele sind dabei beispielsweise die Primärprozesse der Photosynthese, die zur CO<sub>2</sub>-Fixierung führen, die Transportprozesse, die an der Verteilung der Photoassimilate innerhalb der Pflanze beteiligt sind, als auch Stoffwechselwege, die zur Synthese von Speicherstoffen, z.B. von Stärke, Proteinen oder Ölen führen. Beschrieben wurde beispielsweise die Expression einer prokaryontischen Aspara-

gin-Synthetase in pflanzlichen Zellen, wodurch es bei den transgenen Pflanzen u.a. zu einer Steigerung der Biomasseproduktion kommt (EP-B 0 511 979). Ebenfalls vorgeschlagen wurde die Expression einer prokaryontischen Polyphosphatkinase im Cytosol transgener Pflanzen, wodurch es bei Kartoffelpflanzen zu einer Ertragssteigerung in bezug auf das Knollengewicht von bis zu 30 % kommt. Weiterhin wird in der EP-A2 0 442 592 die Expression einer apoplastischen Invertase in Kartoffelpflanzen beschrieben, die ebenfalls zur Erhöhung des Ertrages derartig veränderter transgener Pflanzen führt. Weitere Versuche konzentrierten sich auf die Modifikation der Aktivitäten von Enzymen, die an der Synthese von Saccharose als dem wichtigsten Transportmetaboliten in den meisten Pflanzen beteiligt sind (vgl. z.B. Sonnewald et al., Plant Cell and Environment 17 (1995), 649-658).

In der WO 91/19896 ist weiterhin beschrieben, daß die Erhöhung der Stärkebiosynthese durch Überexpression eines deregulierten Enzyms der ADP-Glucosepyrophosphorylase zu einer verstärkten Allokation von Saccharose in Kartoffelknollen führt, die dort in Form von Stärke gespeichert werden.

Während sich viele dieser Anwendungen mit den Schritten beschäftigen, die entweder zur Bildung von Photoassimilaten in Blättern führen (vgl. auch EP 466 995) oder aber mit der Bildung von Polymeren wie Stärke oder Fructanen in Speicherorganen transgener Pflanzen (z.B. WO 94/04692), gibt es bisher keine erfolgversprechenden Ansätze, die beschreiben, welche Modifikationen in den primären Stoffwechselwegen einzuführen sind, um eine Erhöhung der Glykolyserate zu erreichen. Eine Erhöhung der Glykolyserate ist z.B. für alle jene Prozesse in der Pflanze von Bedeutung, für die größere Mengen von ATP benötigt werden. Dies gilt z.B. für viele Transportprozesse über Membranen, die durch ein Membranpotential bzw. einen Protonengradienten getrieben werden, der durch die Aktivität einer  $H^+$ -ATPase erzeugt wird. Ferner ist eine Erhöhung der Glykolyserate von Bedeutung für das Wachstum im Meristem, die Umsteuerung vom vegetativen zum generativen

Wachstum, sowie für die Synthese verschiedener Speicherstoffe, insbesondere von Ölen.

Somit liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, Pflanzenzellen und Pflanzen mit gesteigerter Glykolyserate sowie Verfahren und DNA-Moleküle zu deren Herstellung zur Verfügung zu stellen.

Die Lösung dieser Aufgabe erfolgt durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung transgene Pflanzenzellen mit einer im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzenzellen gesteigerten Glykolyserate, bei denen es aufgrund der Einführung und Expression von DNA-Sequenzen, die eine cytosolische Invertase codieren, sowie von DNA-Sequenzen, die eine cytosolische Hexokinase codieren, zu einer Erhöhung der Invertase- und Hexokinaseaktivität kommt. Die transgenen Zellen können dabei jeweils eine oder mehrere DNA-Sequenzen enthalten, die eine Invertase bzw. eine Hexokinase codieren.

Es wurde überraschend gefunden, daß durch die Einführung und Expression von DNA-Sequenzen, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Hexokinase codieren, bei gleichzeitiger Einführung und Expression von DNA-Sequenzen, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Invertase codieren, im Cytosol pflanzlicher Zellen, eine drastische Erhöhung der Glykolyserate in derart veränderten Pflanzenzellen im Vergleich zu nicht veränderten Pflanzenzellen erreicht werden kann. Die Expression einer Invertase pilzlichen Ursprungs im Cytosol wurde bereits beschrieben (vgl. EP-A2 442 592). Beschrieben wurde jedoch lediglich die Expression der pilzlichen Invertase im Cytosol pflanzlicher Zellen allein. Nicht beschrieben wurde die Verwendung der cytosolischen Invertase zur Erhöhung der Glykolyserate, ins-

besondere in Kombination mit der Expression einer Hexokinase.

Eine gesteigerte Glykolyserate bedeutet, daß die transgenen Pflanzenzellen, die mit DNA-Sequenzen transformiert wurden, die zur zusätzlichen Synthese einer Invertase und einer Hexokinase im Cytosol der Zellen führen, im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzenzellen eine erhöhte Glykolyserate aufweisen, vorzugsweise eine Glykolyserate, die um mindestens 30 % erhöht ist, insbesondere eine, die um mindestens 50 % bis 100 % erhöht ist, und besonders eine, die um mehr als 100 % bis 200 % erhöht ist, vorzugsweise um mehr als 300 %. Die Bestimmung der Glykolyserate durch Bestimmung der entsprechenden Stoffwechselintermediate ist ausführlich in den Beispielen beschrieben. Die Steigerung der Glykolyserate kann beispielsweise bestimmt werden durch die Konzentrationserhöhung an Glucose-6-Phosphat, Fructose-6-Phosphat, 3-Phosphoglycerat, Pyruvat oder ATP. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung erfolgt die Bestimmung der Steigerung der Glykolyserate vorzugsweise durch Bestimmung der Zunahme an Pyruvat.

Die Steigerung der Glykolyserate wird dabei im Vergleich mit nicht-transformierten Zellen bestimmt. Das bedeutet, daß man Material von Pflanzen, die als Ausgangsmaterial für die Einführung der oben genannten DNA-Sequenzen verwendet wurden, zur Bestimmung der Glykolyserate heranzieht und die bei diesem ermittelte Glykolyserate mit der vergleicht, die Material von Pflanzen der entsprechenden Art oder Linie nach der Transformation mit den oben beschriebenen DNA-Sequenzen aufweist.

Die Bereitstellung größerer Mengen an ATP durch eine gesteigerte Glykolyserate ermöglicht beispielsweise die Steigerung verschiedener energieabhängiger Transport- und Wachstumsprozesse. Die Bereitstellung höherer Pyruvatkonzentrationen als Resultat einer erhöhten Glykolyserate führt zu erhöhten Mengen an AcetylCoA, das beispielsweise für die verstärkte Synthese von Ölen, Fetten oder Isoprenoid-Derivaten verwendet

werden kann. Werden in den Zellen gleichzeitig DNA-Sequenzen exprimiert, die die Synthese von Polyhydroxyalkansäuren ermöglichen, kann das AcetylCoA ebenfalls zur Bildung derartiger Alkansäuren verwendet werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei den DNA-Sequenzen, die eine Invertase bzw. eine Hexokinase codieren, um DNA-Sequenzen, die eine Invertase bzw. Hexokinase codieren, die im Vergleich zu normalerweise in pflanzlichen Zellen vorkommenden Invertasen bzw. Hexokinasen dereguliert oder unreguliert sind. Dereguliert bedeutet dabei, daß diese Enzyme nicht in der gleichen Weise reguliert werden, wie die in nicht-modifizierten Pflanzenzellen normalerweise gebildeten Invertase- und Hexokinaseenzyme. Insbesondere unterliegen diese Enzyme anderen Regulationsmechanismen, d.h. sie werden nicht in demselben Ausmaß durch die in den Pflanzenzellen vorhandenen Inhibitoren inhibiert bzw. durch Metaboliten allosterisch reguliert. Dereguliert bedeutet dabei vorzugsweise, daß die Enzyme eine höhere Aktivität als endogen in Pflanzenzellen exprimierte Invertasen oder Hexokinasen aufweisen. Unreguliert bedeutet im Rahmen dieser Erfindung, daß die Enzyme in pflanzlichen Zellen keiner Regulation unterliegen.

Bei den DNA-Sequenzen, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Invertase codieren, kann es sich sowohl um DNA-Sequenzen handeln, die prokaryontische, insbesondere bakterielle Invertasen codieren, als auch um solche, die eukaryontische, d.h. Invertasen aus Pflanzen, Algen, Pilzen oder tierischen Organismen codieren. Unter den Begriff Pilze fallen im Rahmen dieser Erfindung auch Hefen, insbesondere solche der Gattung *Saccharomyces*, wie z.B. *Saccharomyces cerevisiae*. Bei den durch die Sequenzen codierten Enzymen kann es sich sowohl um bekannte in der Natur vorkommende Enzyme handeln, die eine abweichende Regulation durch verschiedene Substanzen aufweisen, insbesondere durch die pflanzlichen Invertaseinhibitoren, als auch um Enzyme, die

durch Mutagenese von DNA-Sequenzen, die bekannte Enzyme aus Bakterien, Algen, Pilzen, Tieren oder Pflanzen codieren, hergestellt wurden.

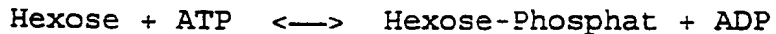
In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung codieren die DNA-Sequenzen Proteine mit der enzymatischen Aktivität einer Invertase aus Pilzen. Derartige Enzyme weisen den Vorteil auf, daß sie im Vergleich zu pflanzlichen Invertasen nicht durch pflanzliche Invertaseinhibitoren reguliert werden. Bevorzugt werden DNA-Sequenzen verwendet, die eine Invertase aus *Saccharomyces* codieren. Derartige Sequenzen sind bekannt und beschrieben (vgl. Taussig et al., *Nucleic Acids Res.* 11 (1983), 1943-1954; EP-A2 0 442 592). Um die Lokalisation der Invertase im Cytosol der pflanzlichen Zellen sicherzustellen, müssen möglicherweise vorhandene DNA-Sequenzen, die Signalpeptide codieren, deletiert werden, und die codierende Region gegebenenfalls mit einem neuen Startcodon versehen werden (vgl. EP-A2 0 442 592). Bekannt sind neben der genannten DNA-Sequenz aus *Saccharomyces cerevisiae* auch weitere DNA-Sequenzen, die Proteine mit der enzymatischen Aktivität einer Invertase codieren (vgl. EMBL Accession number X67744 *S. xylosus*, M26511 *V. alginolyticus*, L08094 *Zymomonas mobilis*, L33403 *Zymomonas mobilis*, U16123 *Zea mays*, U17695 *Zea mays*, X17604 *S. occidentalis*, Z22645 *S. tuberosum*, Z21486 *S. tuberosum*, M81081 *Tomate*, Z35162 *V. faba*, Z35163 *V. faba*, D10265 *V. radiata*, Z12025 *L. esculentum*, Z12028 *L. pimpinellifolium*, Z12026 *L. pimpinellifolium*, X73601 *A. sativa*, S70040 acid invertase, V01311 yeast gene, U11033 *Arabidopsis thaliana*, X81795 *B. vulgaris* BIN35, X81796 *B. vulgaris*, X81797 *B. vulgaris*, X81792 *C. rubrum*, X81793 *C. rubrum*, X77264 *L. esculentum*, Z12027 *L. esculentum*, D10465 *Z. mobilis*, D17524 *Zymomonas mobilis*) und die aufgrund ihrer Eigenschaften ebenfalls zur Herstellung der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen verwendet werden können, wobei darauf geachtet werden muß, daß das Protein im Cytosol der pflanzlichen Zelle gebildet wird. Techniken zur Modifikation derartiger DNA-Se-



quenzen, um die Lokalisierung der synthetisierten Enzyme im Cytosol der pflanzlichen Zellen sicherzustellen, sind dem Fachmann bekannt. Für den Fall, daß die Invertasen Sequenzen enthalten, die zur Sekretion oder für eine bestimmte subzelluläre Lokalisation notwendig sind, z.B. zur Lokalisierung im extrazellulären Raum oder der Vakuole, müssen die entsprechenden DNA-Sequenzen deletiert werden.

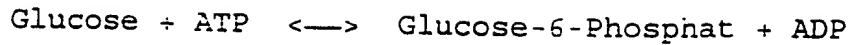
Bei den DNA-Sequenzen, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Hexokinase codieren, kann es sich sowohl um solche handeln, die prokaryontische, insbesondere bakterielle Invertasen codieren, als auch um solche, die eukaryontische Invertasen, d.h. solche aus Pflanzen, Algen, Pilzen oder tierischen Organismen codieren.

Hexokinasen (EC 2.7.1.1) sind Enzyme, die folgende Reaktion katalysieren:



Bei den durch die DNA-Sequenzen codierten Hexokinasen kann es sich sowohl um bekannte in der Natur vorkommende Enzyme handeln, die eine abweichende Regulation durch verschiedene Substanzen aufweisen, als auch um Enzyme, die durch Mutagenese aus DNA-Sequenzen, die bekannte Enzyme aus Bakterien, Algen, Pilzen, Tieren oder Pflanzen codieren, hergestellt wurden. DNA-Sequenzen, die Enzyme mit Hexokinaseaktivität codieren sind aus einer ganzen Reihe von Organismen beschrieben, beispielsweise aus *Saccharomyces cerevisiae*, Mensch, Ratte und diversen Mikroorganismen (für die DNA-Sequenzen siehe: EMBL-Genbank Zugriffsnummern M92054, LO4480, M65140, X61680, M14410, X66957, M75126, J05277, J03228, M68971, M86235, X63658).

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um DNA-Sequenzen, die Glucokinasen codieren, insbesondere Glucokinasen, die einer verringerten allosterischen Regulation, durch z.B. Glucose-6-Phosphat, unterliegen. Glucokinasen (E C 2.7.1.2) sind Hexokinasen mit einer hohen Affinität für Glucose, die folgende Reaktion katalysieren:



In einer bevorzugten Ausführungsform codieren die DNA-Sequenzen eine Glucokinase aus *Zymomonas mobilis* (Barnell et al., J. Bacteriol. 172 (1990), 7227-7240; EMBL-Genbank Zugriffsnummer M50615). Weitere Glucokinasen sind aus Mensch und Ratte beschrieben (für die DNA-Sequenzen siehe: EMBL-Genbank Zugriffsnummern M69051, M90299, JO4218 und M25807).

Weiterhin können DNA-Sequenzen, die eine Invertase oder eine Hexokinase codieren, unter Zuhilfenahme der bereits bekannten oben genannten DNA-Sequenzen aus beliebigen Organismen isoliert werden. Methoden für die Isolierung und Identifizierung derartiger DNA-Sequenzen sind dem Fachmann geläufig, beispielsweise die Hybridisierung mit bekannten Sequenzen oder durch Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung von Primern, die von bekannten Sequenzen abgeleitet sind.

Die von den identifizierten DNA-Sequenzen codierten Enzyme werden anschließend hinsichtlich ihrer Enzymaktivität und Regulation untersucht. Verfahren zur Bestimmung der Invertase- bzw. Hexokinase-Aktivitäten sind dem Fachmann geläufig.

Durch Einführung von Mutationen und Modifikationen nach dem Fachmann bekannten Techniken, können die durch die DNA-Sequenzen codierten Proteine weiter in ihren regulatorischen Eigenschaften verändert werden, um de- oder unregulierte Enzyme zu erhalten.

Zur Expression in pflanzlichen Zellen, können die DNA-Sequenzen, die eine cytosolische Invertase bzw. Hexokinase codieren, im Prinzip unter der Kontrolle eines beliebigen in pflanzlichen Zellen funktionalen Promotors stehen. Die Expression der besagten DNA-Sequenzen kann generell in jedem Gewebe einer aus einer transformierten erfindungsgemäßen Pflanzenzelle regenerierten Pflanze und zu jedem Zeitpunkt stattfinden, bevorzugt jedoch findet sie in solchen Geweben

statt, in denen eine erhöhte Glykolyserate von Vorteil entweder für das Wachstum der Pflanze, für die Aufnahme und den Transport von Ionen und Metaboliten oder aber für die Bildung von Inhaltsstoffen innerhalb der Pflanze ist. Geeignet erscheinen von daher vor allem Promotoren, die eine spezifische Expression in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt der Pflanze oder aber in einem bestimmten Organ der Pflanze sicherstellen. Besonders geeignet für die Steigerung der Fettsäurebiosynthese infolge eines erhöhten AcetylCoA-Gehaltes in Samen von ölbildenden Pflanzen wie Raps, Sojabohne, Sonnenblume und Ölpalmen erscheinen daher Promotoren, die spezifisch im Endosperm oder aber in den Cotyledonen von sich bildenden Samen aktiv sind. Solche Promotoren sind z.B. der Phaseolin-Promotor aus *Phaseolus vulgaris*, der USP-Promotor aus *Vicia faba* oder der HMG-Promotor aus Weizen.

Vorteilhaft ist ferner die Verwendung von Promotoren, die eine samenspezifische Expression gewährleisten. Im Fall von Stärke-speichernden Pflanzen, wie z.B. von Mais, Weizen, Gerste oder anderen Getreiden wird dadurch in den Samen die Glykolyserate erhöht, und es findet eine erhöhte Bildung von Pyruvat und AcetylCoA und eine verstärkte Fettsäurebiosynthese statt. Dies bedeutet, daß eine Veränderung des Flusses der Photoassimilate von der Stärke in Richtung von Pyruvat-abhängigen Biosynthesewegen, wie z.B. der Fettsäurebiosynthese, erfolgt.

Bevorzugt ist auch die Verwendung von Promotoren, die in Speicherorganen wie Knollen oder Wurzeln aktiv sind, z.B. in der Speicherwurzel der Zuckerrübe oder aber in der Knolle der Kartoffel. In diesem Fall kommt es bei der Expression der DNA-Sequenzen, die eine Invertase bzw. Hexokinase codieren, zu einer Umlenkung von Biosynthesewegen im Sinne der Bildung von weniger Zucker bzw. Stärke und einer erhöhten Bildung von Pyruvat und Acetyl-CoA aufgrund der erhöhten Glykolyserate.

Ferner kann die Expression der DNA-Sequenzen unter der Kontrolle von Promotoren erfolgen, die spezifisch zum Zeitpunkt

der Blühinduktion aktiviert werden oder die aktiv sind in Geweben, die für die Blühinduktion notwendig sind. Ebenso können Promotoren verwendet werden, die zu einem nur durch äußere Einflüsse kontrollierten Zeitpunkt aktiviert werden, z.B. durch Licht, Temperatur, chemische Substanzen (s. beispielsweise WO 93/07279). Für die Erhöhung der Aufnahmerate von Ionen aus dem Boden infolge eines erhöhten ATP-Gehaltes sind z.B. Promotoren von Interesse, die eine Wurzelhaar- oder Wurzel-Epidermis-spezifische Expression aufweisen. Für die Erhöhung der Exportrate von Photoassimilaten aus dem Blatt sind z.B. Promotoren von Interesse, die eine Geleitzellen-spezifische Expression aufweisen. Solche Promotoren sind bekannt (z.B. der Promotor des rolC-Gens aus *Agrobacterium rhizogenes*).

Ferner können die DNA-Sequenzen, die eine Invertase bzw. Hexokinase codieren, außer mit einem Promotor, vorteilhafterweise mit DNA-Sequenzen verknüpft sein, die eine weitere Steigerung der Transkription gewährleisten, beispielsweise sogenannte Enhancer-Elemente, oder mit DNA-Sequenzen, die im transkribierten Bereich liegen und die eine effizientere Translation der synthetisierten RNA in das entsprechende Protein gewährleisten (sogenannte Translations-Enhancer). Derartige Regionen können von viralen Genen oder geeigneten pflanzlichen Genen gewonnen oder synthetisch hergestellt werden. Sie können homolog oder heterolog zum verwendeten Promotor sein. Vorteilhafterweise werden die DNA-Sequenzen, die eine Invertase oder eine Hexokinase codieren, mit 3'-nicht-translatierten DNA-Sequenzen verknüpft, die die Termination der Transkription und die Polyadenylierung des Transkriptes gewährleisten. Derartige Sequenzen sind bekannt und beschrieben, beispielsweise die des Octopinsynthasegens aus *Agrobacterium tumefaciens*. Diese Sequenzen sind beliebig gegeneinander austauschbar.

Die DNA-Sequenzen, die eine Invertase bzw. Hexokinase codieren, liegen in den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen vorzugsweise stabil ins Genom integriert vor.

Bei den transgenen Pflanzenzellen, die aufgrund der zusätzlichen Expression einer cytosolischen Invertase und einer cytosolischen Hexokinase eine gesteigerte Glykolyserate aufweisen, kann es sich grundsätzlich um Zellen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln. Von Interesse sind sowohl Zellen monocotyler als auch dicotyler Pflanzenspezies, insbesondere Zellen stärke-speichernder, ölspeichernder oder landwirtschaftlicher Nutzpflanzen, wie z.B. Roggen, Hafer, Gerste, Weizen, Kartoffel, Mais, Reis, Raps, Erbse, Zuckerrübe, Sojabohne, Tabak, Baumwolle, Sonnenblume, Ölpalme, Wein, Tomate usw. oder Zellen von Zierpflanzen.

Außer durch eine gesteigerte Glykolyserate lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen von entsprechenden nicht-transformierten Pflanzenzellen dadurch unterscheiden, daß sie stabil ins Genom integriert fremde DNA-Sequenzen enthalten, die eine cytosolische Invertase bzw. eine cytosolische Hexokinase codieren. Der Begriff "fremde DNA-Sequenz" bedeutet dabei in diesem Zusammenhang folgendes: Es kann sich dabei zum einen um DNA-Sequenzen handeln, die in bezug auf die transformierte Pflanzenzelle heterolog sind, d.h. natürlicherweise in einer solchen Pflanzenzelle nicht vorkommen. Handelt es sich bei den DNA-Sequenzen um solche, die natürlicherweise in den transformierten Pflanzenzellen vorkommen, so bedeutet "fremd", daß sie in dem Genom der transformierten Pflanzenzellen an einem Ort integriert sind, an dem sie natürlicherweise nicht vorkommen, d.h. sie liegen in einer neuen genomischen Umgebung. Verifizieren läßt sich dies beispielsweise durch eine Southern-Blot-Analyse. Ferner handelt es sich bei den in die Pflanzenzellen eingeführten DNA-Molekülen in der Regel um rekombinante DNA-Moleküle, d.h. um Moleküle, die aus verschiedenen Segmenten zusammengesetzt sind, die in dieser Kombination nicht in der Natur vorkommen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ferner transgene Pflanzen, die erfindungsgemäße transgene Pflanzenzellen ent-

halten. Derartige Pflanzen können beispielsweise durch Regeneration aus einer erfindungsgemäßen Pflanzenzelle erzeugt werden.

Durch die Bereitstellung von Pflanzenzellen mit einer gesteigerten Glykolyserate ist es nun möglich, transgene Pflanzen mit veränderten vorteilhaften Eigenschaften herzustellen. So kann beispielsweise durch die Steigerung der Glykolyserate spezifisch in Geleitzellen transgener Pflanzen die Beladung des Siebelement-Geleitzellen-Komplexes mit Saccharose durch den Saccharose-Protonen-Cotransporter gesteigert werden, was zu einer Erhöhung der Transportrate von Photoassimilaten führt. In gleicher Weise kann die Aufnahme von anorganischen Ionen wie Phosphat, Sulfat, Nitrat u.a. aus dem Boden über die Wurzel gesteigert werden.

Eine Steigerung der Glykolyserate spezifisch in Wurzelzellen, insbesondere in Wurzelhaaren und Epidermiszellen, kann aufgrund der gesteigerten  $H^+$ -ATPase-Aktivität zu einer verstärkten Ausscheidung von Protonen in den Boden führen. Eine derartige Ansäuerung des Bodens führt zur Mobilisierung und somit erleichterten Aufnahme verschiedener Mineralien, wie z.B. Phosphat aus dem Boden.

Von besonderer Bedeutung ist die Möglichkeit, durch Erhöhung der Glykolyserate in ölspeichernden Geweben einer Pflanze, wie z.B. dem Endosperm oder den Cotyledonen von Samen oder in anderen ölspeichernden Organen, den Fluß der in den Samen bzw. Organen abgelieferten Photoassimilate in Richtung der Bildung von Pyruvat und AcetylCoA zu lenken. Die Bereitstellung von erhöhten Mengen dieser Vorstufen für die Biosynthese von Triglyceriden führt zu einer gesteigerten Synthese von Ölen und somit zu einem erhöhten Ertrag. Eine Bereitstellung von erhöhten Mengen an AcetylCoA ist auch für viele andere natürlicherweise in Pflanzen ablaufende Prozesse wie die Isoprenoid-Biosynthese, aber auch für die Bildung von Polymeren wie Polyhydroxyalkansäuren von Bedeutung (vgl. z.B. Poivier et al., Bio/Technology 13 (1995), 142-150).

Durch eine Erhöhung der Glykolyserate in stärkepeichernden Geweben, beispielsweise in Samen verschiedenster Getreidearten oder in den Knollen der Kartoffel, kommt es zu einer Veränderung des Flusses der Photoassimilate von der Stärkebiosynthese in Richtung Pyruvat-abhängiger Biosynthesewege, beispielsweise der Fettsäurebiosynthese. Das Resultat ist eine Verringerung der Stärkemenge in dem entsprechenden Gewebe bei eventueller gleichzeitiger Zunahme der Fettsäurebiosynthese.

Weiterhin ist von Bedeutung, daß die durch die Steigerung der Glykolyserate erzeugten hohen AcetylCoA-Konzentrationen auch zu einer erhöhten Isoprenoidsynthese oder, in Kombination mit der Expression entsprechender Gene für die Synthese von Polyhydroxyalkansäuren, zu einer Polyhydroxyalkansäuresynthese in den transgenen Pflanzenzellen führen kann.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzenzellen, die im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzenzellen eine gesteigerte Glykolyserate aufweisen, bei dem in pflanzliche Zellen DNA-Sequenzen eingebracht werden, die eine cytosolische Invertase codieren, sowie DNA-Sequenzen, die eine cytosolische Hexokinase codieren, und diese Sequenzen in den transformierten Pflanzenzellen exprimiert werden.

Ein derartiges Verfahren besteht vorzugsweise aus den folgenden Schritten:

- (a) Herstellung eines rekombinanten doppelsträngigen DNA-Moleküls, das folgende DNA-Sequenzen umfaßt:
  - (i) einen Promotor, der die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleistet;
  - (ii) eine DNA-Sequenz, die ein cytosolisches Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Invertase codiert und in sense-Richtung mit dem Promotor verknüpft ist;
- (b) die Herstellung eines rekombinanten doppelsträngigen DNA-Moleküls, das folgende DNA-Sequenzen umfaßt:

- (i) einen Promotor, der die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleistet;
- (ii) eine DNA-Sequenz, die ein cytosolisches Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Hexokinase codiert und in sense-Richtung mit dem Promotor verknüpft ist; und
- (c) Transfer der gemäß Schritt (a) und (b) hergestellten DNA-Moleküle in pflanzliche Zellen.

Für die Wahl der Pflanzenspezies, der Promotoren, weiterer flankierender DNA-Sequenzen, sowie für die Wahl und Modifikationen der DNA-Sequenzen, die eine Invertase bzw. eine Hexokinase codieren, gilt dasselbe was bereits oben im Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Zellen ausgeführt wurde.

Die DNA-Sequenzen, die eine Invertase bzw. eine Hexokinase codieren, können entweder auf getrennten DNA-Molekülen lokalisiert sein, oder gemeinsam auf einem rekombinanten DNA-Molekül. Befinden sich die Sequenzen auf zwei verschiedenen DNA-Molekülen, kann der Transfer der DNA-Moleküle entweder gleichzeitig erfolgen, oder derart, daß Pflanzenzellen zunächst mit einem DNA-Molekül transformiert werden und selektierte Pflanzenzellen oder Pflanzen anschließend mit dem zweiten DNA-Molekül transformiert werden. Ferner können Pflanzen, die sowohl eine zusätzliche cytosolische Invertase als auch eine zusätzliche cytosolische Hexokinase exprimieren, hergestellt werden, indem zunächst zwei unabhängige transgene Pflanzenlinien erzeugt werden, die eine Invertase bzw. eine Hexokinase codieren, und diese anschließend gekreuzt werden.

Der Transfer der DNA-Moleküle, die DNA-Sequenzen enthalten, die Invertase bzw. Hexokinase codieren, erfolgt vorzugsweise unter Verwendung von Plasmiden, insbesondere solchen Plasmiden, die eine stabile Integration des DNA-Moleküls in das Genom transformierter Pflanzenzellen gewährleisten, beispielsweise binären Plasmiden oder Ti-Plasmiden des



Agrobacterium tumefaciens-Systems. Neben dem Agrobacterium-System kommen andere Systeme zur Einführung von DNA-Molekülen in pflanzliche Zellen in Frage, wie z.B. das sogenannte biolistische Verfahren oder aber die Transformation von Protoplasten (vgl. Willmitzer L. (1993), Transgenic Plants, Biotechnology 2; 627-659 für eine Übersicht). Zur Transformation kommen grundsätzlich Zellen aller Pflanzenspezies in Frage. Von Interesse sind sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Für verschiedene monokotyle und dikotyle Pflanzenspezies sind bereits Transformationstechniken beschrieben worden. Bevorzugt werden in den Verfahren Zellen landwirtschaftlicher Nutzpflanzen verwendet, insbesondere von Getreidearten, z.B. Roggen, Hafer, Gerste, Weizen, Kartoffel, Mais, Reis, Raps, Erbse, Zuckerrübe, Sojabohne, Tabak, Baumwolle, Sonnenblume, Ölpalme, Wein, Tomate usw. oder Zellen von Zierpflanzen. Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls die aus dem Verfahren erhältlichen transgenen Pflanzenzellen und aus diesen durch Regeneration erhältliche Pflanzen, die aufgrund der zusätzlichen Expression einer cytosolischen Invertase und einer cytosolischen Hexokinase eine Steigerung der Glykolyserate aufweisen.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung Vermehrungsmaterial erfindungsgemäßer Pflanzen, das erfindungsgemäße Zellen enthält. Dabei kann es sich um jedwede Art von Geweben oder Organen der erfindungsgemäßen Pflanzen handeln, die die Vermehrung ermöglichen. Hierzu zählen beispielsweise Gewebekulturen erfindungsgemäßer Zellen, Samen, Früchte, Wurzelstöcke, Stecklinge, Sämlinge, Knollen etc.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner rekombinante DNA-Moleküle, die eine DNA-Sequenz enthalten, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Hexokinase, vorzugsweise eine Glucokinase, codiert, in Kombination mit DNA-Sequenzen, die die Transkription und Translation in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Bei der Hexokinase handelt es

sich vorzugsweise um ein dereguliertes oder unreguliertes Enzym.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung rekombinante DNA-Moleküle, die folgende DNA-Sequenzen umfassen:

- (i) eine DNA-Sequenz, die eine cytosolischen Invertase codiert, in Kombination mit DNA-Sequenzen, die die Transkription und Translation in pflanzlichen Zellen gewährleisten; und
- (ii) eine DNA-Sequenz, die eine cytosolische Hexokinase codiert, in Kombination mit DNA-Sequenzen, die die Transkription und Translation in pflanzlichen Zellen gewährleisten.

Für die Wahl der DNA-Sequenzen, die die Transkription und Translation in pflanzlichen Zellen erlauben, gilt bei den rekombinanten DNA-Molekülen dasselbe, was oben bereits im Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Zellen und Verfahren ausgeführt wurde, ebenso wie für die Wahl der DNA-Sequenzen, die für eine Invertase bzw. Hexokinase codieren.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von DNA-Sequenzen, die eine Invertase codieren, vorzugsweise eine deregulierte oder unregulierte, zur Herstellung transgener Pflanzenzellen, die im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzenzellen eine gesteigerte Glykolyserate aufweisen. Ebenso ist Gegenstand der Erfindung die Verwendung von DNA-Sequenzen, die eine Hexokinase codieren, vorzugsweise eine deregulierte oder unregulierte, zur Herstellung von transgenen Pflanzenzellen, die im Vergleich zu nicht transformierten Pflanzenzellen eine gesteigerte Glykolyserate aufweisen.

## Beschreibung der Abbildung

Fig. 1 zeigt das 12,68 kb große Plasmid pB33Hyg-GK. Das Plasmid enthält folgende Fragmente:

- A = Fragment A (1498 bp) enthält das DraI - DraI Fragment (Position -1512 bis Position +14) der Promotorregion des Patatin Gens B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29).
- B = Fragment B (1025 bp) beinhaltet ein DNA-Fragment mit der Codierregion der Glucokinase aus *Zymomonas mobilis* (GenEMBL Accession Nummer: M60615; Nucleotide 5128 bis 6153).
- C = Fragment C (192 bp) beinhaltet das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmides pTi-ACH5, Nucleotide 11749-11939.

## Methoden

### 1. Clonierungsverfahren

Zur Clonierung in *E. coli* wurde der Vektor pUC18 verwendet. Für die Pflanzentransformation wurden die Genkonstruktionen in den binären Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Sci. 66 (1990), 221-233) cloniert.

### 2. Bakterienstämme

Für die pUC-Vektoren und für die pBinAR-Konstrukte wurde der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburgh, USA) verwendet.

Die Transformation der Plasmide in die Kartoffelpflanzen wurde mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens*-Stammes C58C1 pGV2260 durchgeführt (Deblaere et al., Nucl. Acids Res. 13 (1985), 4777-4788).

### 3. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Der Transfer der DNA erfolgte durch direkte Transformation nach der Methode von Höfigen und Willmitzer (Nucleic Acids Res. 16 (1988), 9877). Die Plasmid-DNA transformierter Agrobakterien wurde nach der Methode von Birnboim und Doly (Nucleic Acids Res. 7 (1979), 1513-1523) isoliert und nach geeigneter Restriktionsspaltung gelelektrophoretisch analysiert.

### 4. Transformation von Kartoffeln

Zehn kleine mit dem Skalpell verwundete Blätter einer Kartoffel-Sterilkultur (*Solanum tuberosum* L. cv. Desirée) wurden in 10 ml MS-Medium (Murashige und Skoog, Physiol. Plant 15 (1962), 473) mit 2 % Saccharose gelegt, welches 50 µl einer unter Selektion gewachsenen *Agrobacterium tumefaciens*-Übernachtskultur enthielt. Nach 3-5-minütigem leichtem Schütteln erfolgte eine weitere Inkubation für 2 Tage im Dunkeln. Daraufhin wurden die Blätter zur Kallusinduktion auf MS-Medium mit 1,6 % Glucose, 5 mg/l Naphthylelessigsäure, 0,2 mg/l Benzylaminopurin, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin und 0,80 % Bacto Agar gelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei 25°C und 3000 Lux wurden die Blätter zur Sproßinduktion auf MS-Medium mit 1,6 % Glucose, 1,4 mg/l Zeatinribose, 20 mg/l Naphthylelessigsäure, 20 mg/l Giberellinsäure, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin und 0,80 % Bacto Agar gelegt.

### 5. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe eines DNA-Random Primer Labelling Kits der Firma Boehringer (Deutschland) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

## 6. Pflanzenhaltung

Kartoffelpflanzen wurden im Gewächshaus unter folgenden Bedingungen gehalten:

- Lichtperiode 16 h bei 25000 Lux und 22°C
- Dunkelperiode 8 h bei 15°C
- Luftfeuchte 60 %.

## 7. Bestimmung des Stärkegehaltes und der Trockensubstanz von Kartoffelknollen

Die Bestimmung des Stärkegehaltes und der Trockensubstanz der Kartoffelknolle erfolgte mittels der Bestimmung des spezifischen Gewichtes (Schéele et al., Landw. Vers. Sta. 127 (1937), 67-96) nach den folgenden Formeln:

$$\% \text{ Trocken-} = 24,182 + 211,04 \times (\text{spez. Gew.} - 1.0988)$$
$$\text{substanz}$$

$$\% \text{ Stärke} = 17,546 + 199,07 \times (\text{spez. Gew.} - 1.0988)$$

## 8. Bestimmung phosphorylierter Stoffwechselintermediate in Kartoffelknollen

Die Bestimmung phosphorylierter Stoffwechselintermediate in Kartoffelknollen erfolgte mit geringen Abänderungen nach Weiner und Stitt (Biochim. Biophys. Acta 893 (1987), 13-21).

### Darstellung des Kartoffelknollenextraktes:

Es wurden jeweils ca. 200 mg Knollenmaterial unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser homogenisiert. Die phosphorylierten Intermediate wurden mit 16%iger Trichloressigsäurelösung in Diethylether extrahiert. Nach dreistündiger Inkubation auf Eis wurde durch dreimaliges Extrahieren mit Diethylether die Trichloressigsäure entfernt. Danach wurden die Extrakte mit 5 M KOH/1 M Triethanolamin neutralisiert. Die Bestimmung von

Phosphoenolpyruvat (PEP) und Pyruvat erfolgte sofort. Für die Bestimmung der anderen Intermediate kann der Extrakt bei  $-70^{\circ}\text{C}$  mehrere Tage aufbewahrt werden.

Die Bestimmung der phosphorylierten Intermediate erfolgte an einem Zweiwellenlängenphotometer (Sigma ZWS 11) mittels gekoppelter enzymatischer Reaktionen nach Stitt et al. (Methods in Enzymology 174, 518-552).

a) Bestimmung von PEP und Pyruvate

Der Reaktionspuffer enthielt: 50 mM Hepes-KOH pH 7,0;  
5 mM  $\text{MgCl}_2$ ;  
0,025 mM NADH;  
1 mM ATP

Pyruvat-Bestimmung: 1 U/ml Lactatdehydrogenase

PEP-Bestimmung: +2 U/ml Pyruvatkinase

Die Messung erfolgt bei  $25^{\circ}\text{C}$  mit 50 bis 100  $\mu\text{l}$  Extrakt.

b) Bestimmung von UPD-Glucose (UDPG)

Der Reaktionspuffer enthielt: 200 mM Glycin pH 8,7;  
5 mM  $\text{MgCl}_2$ ;  
1 mM NAD;

0,025 U/ml UDP-Glucose Dehydrogenase

Die Messung erfolgt bei  $25^{\circ}\text{C}$  mit 50 bis 100  $\mu\text{l}$  Extrakt.

c) Bestimmung von Glucose-6-Phosphat (G6P), Fructose-6-Phosphat (F6P) und Glucose-1-Phosphat (G1P)

Der Reaktionspuffer enthielt: 50 mM Hepes-KOH pH 7,0;  
5 mM  $\text{MgCl}_2$ ;  
0,25 mM NADP

G6P-Bestimmung: 2 U/ml Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase

F1P-Bestimmung: + 2 U/ml Phosphoglucoisomerase

G1P-Bestimmung: + 2 U/ml Phosphoglucomutase

Die Messung erfolgt bei  $25^{\circ}\text{C}$  mit 50 bis 100  $\mu\text{l}$  Extrakt.

d) Bestimmung von ATP

Der Reaktionspuffer enthielt: 50 mM Hepes-KOH pH 7,0;  
5 mM  $MgCl_2$ ;  
0,25 mM NADP;  
1 mM Glucose;  
2 U/ml Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase;  
2 U/ml Phosphoglucoisomerase;  
1 U/ml Hexokinase

Die Messung erfolgt bei 25°C mit 50 bis 100  $\mu$ l Extrakt

e) Bestimmung von ADP

Der Reaktionspuffer enthielt: 50 mM Hepes-KOH pH 7,0;  
5 mM  $MgCl_2$ ;  
0,05 mM NADH;  
0,2 mM PEP;  
0,2 U/ml Lactatdehydrogenase;  
1 U/ml Pyruvatkinase

Die Messung erfolgt bei 25°C mit 50 bis 100  $\mu$ l Extrakt

f) Bestimmung von 3-Phosphoglycerat (3-PGA)

Der Reaktionspuffer enthielt: 100 mM Tris-HCl pH 8,1;  
5 mM  $MgCl_2$ ;  
0,05 mM NADH,  
1,33 mM ATP;  
0,1 U/ml Phosphoglyceratkinase;  
2 U/ml Glyceraldehydphosphatdehydrogenase

Die Messung erfolgt bei 25°C mit 50 bis 100  $\mu$ l Extrakt

9. Bestimmung der Aktivität von Enzymen des Kohlehydratstoffwechsels in Kartoffelknollen

Zur Bestimmung von Enzymaktivitäten (z.B. der Glucokinase, Fructokinase, Saccharosesynthase, Invertase, Phosphoglucomutase, Phosphofructokinase, Glyceraldehyd-

3-Phosphatdehydrogenase, Phosphoglyceratkinase, Phosphoglyceratmutase oder Pyruvatkinase) in Kartoffelknollen wurden 200 mg Knollenmaterial in 500  $\mu$ l Extraktionspuffer (50 mM Hepes-KOH pH 7,5; 5 mM  $MgCl_2$ ; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 2 mM Benzamidin; 2 mM  $\epsilon$ -Amino-n-Capronsäure; 0,5 mM PMSF; 10 % (Vol./Vol.) Glycerin; 0,1 % (Vol./Vol.) Triton X-100) homogenisiert. Nach Zentrifugation werden 10 bis 40  $\mu$ l des zellfreien entsalzten Extraktes für die Enzymaktivitätsmessung eingesetzt. Die Enzymaktivitäten wurden mit Ausnahme der Saccharosesynthase- und Invertase-Aktivität mittels gekoppelter enzymatischer Reaktionen an einem Spektralphotometer bestimmt.

Die Glucokinase- und Fructokinase-Aktivität wurde nach Renz et al. (Planta 190 (1993), 156-165), die Saccharosesynthase- und Invertase-Aktivität nach Zrenner et al. (Plant J. 7 (1995), 97-107), die Phosphofructokinase-, Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase-, Phosphoglyceratkinase-, Phosphoglyceratmutase-, Pyruvatkinase-Aktivität nach Burell et al. (Planta 194 (1994), 95-101), und die Phosphoglucomutase-Aktivität nach Pressey (Journal of Food Science 32 (1967), 381-385) bestimmt.

#### 10. Bestimmung des Gasaustausches von Kartoffelknollen

Knollen (ungefähr 30 g) wurden direkt von Pflanzen aus dem Gewächshaus genommen und innerhalb von 30 Minuten in einen Infrarot Gasanalysator (Binos 100 Rosemound, Düsseldorf, FRG) gelegt. Die Bestimmung der  $CO_2$ -Produktion erfolgte über 20 Minuten bei 20°C und die Auswertung mit der Software von Waltz (Effeltrich, FRG).

Die Beispiele erläutern die Erfindung.



### Beispiel 1

#### Konstruktion des binären Plasmides p33-Cy-Inv

Die Herstellung des Plasmides p33-Cy-Inv und Einführung des Plasmides in das Genom der Kartoffel ist in EP-A2 0 442 592 beschrieben worden. Regenerierte Kartoffelpflanzen, die mit dem binären Konstrukt p33-Cy-Inv transformiert worden sind, wurden in Erde transferiert und bezüglich der Invertaseaktivität selektiert. Dabei wurden mehrere Genotypen identifiziert, die eine bis zu hundertfach erhöhte Invertaseaktivität, verglichen mit den Kontrollpflanzen, aufweisen.

### Beispiel 2

#### Konstruktion des binären Plasmides pB33Hyg-GK

Für die Pflanzentransformation wurde die Codierregion des Glucokinasegens aus *Zymomonas mobilis* mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) ausgehend von genomischer *Zymomonas mobilis* DNA amplifiziert. Die Sequenz der Glucokinase aus *Zymomonas mobilis* ist in der GenEMBL-Datenbank mit der Accession Nummer M60615 eingetragen. Das amplifizierte Fragment entspricht der Region von den Nucleotiden 5128 bis 6153 dieser Sequenz. Hierbei wurde am 5'-Ende eine Asp718-Schnittstelle und am 3'-Ende eine HindIII-Schnittstelle eingefügt. Das 1025 bp lange PCR Fragment wurde über die beiden zusätzlichen Schnittstellen in den Vektor pUCBM20 cloniert. Ausgehend von diesem Plasmid wurde die gesamte Codierregion der Glucokinase nach Restriktionsverdau mit EcoRI und HindIII in den Vektor pBluescriptSK subcloniert. In Extrakten von *E. coli*-Zellen, die das resultierende Plasmid pSK-GK enthielten, wurde eine verglichen mit Extrakten von untransformierten *E. coli*-Zellen 100-fach erhöhte Glucokinaseaktivität nachgewiesen. Hierzu wurden die Zellen einer 20 ml Übernachtskultur geerntet und in 500 µl Extraktionspuffer resuspendiert (30 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 10 mM 2-Mercaptoetha-

nol; 0,1 % (Vol./Vol.) Nonidet P40). Nach Zugabe des gleichen Volumens Säure-gewaschener Glasperlen (0,1 mm Durchmesser) wurde die Suspension viermal für 30 Sekunden heftig durchmischt. Nach Zentrifugation wurde die Glucokinaseaktivität im zellfreien Extrakt wie bei Scopes et al. (Biochem. J. 228 (1985), 627-634) bestimmt.

Nachdem auf diese Weise die Funktionalität des PCR-Produktes nachgewiesen worden war, wurde die Insertion in einen binären Vektor, der sich von pBIN19 (Bevan, Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711-8720) ableitet, umcloniert. Dabei wurde folgendes Plasmid erstellt: das Plasmid pB33Hyg-GK (vgl. Fig. 1). Das Konstrukt enthält als Promotor für die Expression eines Transgens in Pflanzen den B33 Promotor von *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29).

Das Konstrukt pB33Hyg-GK wurde wie folgt erstellt:

Da das Konstrukt für die Transformation von bereits transgenen Kartoffelpflanzen, die das NPT-II-Gen exprimieren, eingesetzt werden sollte, wurde das Plasmid pBIB, welches das HPT-Gen codierend für die Hygromycin B Phosphotransferase enthält, benutzt (Becker, Nucl. Acids Res. 18 (1990), 203).

Der Promotor des B33 Gens von *Solanum tuberosum* wurde als *DraI*-Fragment (Position -1512 bis +14 nach Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) nach Abbau überstehender Enden mit Polymerase II in die *SacI*-Schnittstelle des Plasmids pUC19 cloniert. Als *EcoRI*/*SmaI*-Fragment wurde die Promotorregion in den binären Vektor pBIN19 cloniert, der das Terminationssignal des Octopinsynthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* in direkter Nachbarschaft zu einem Polylinker aus M13mp19 enthält. Hierbei entstand pB33. Das Promotor-Polylinker-Terminator Fragment des Plasmids pB33 wurde als *EcoRI*/*HindIII*-Fragment in das mit *EcoRI* und *HindIII* linearisierte Plasmid pBIB cloniert. Hierbei entstand das Plasmid pB33Hyg.

Die Codierregion der Glucokinase wurde anschließend nach *Asp718/SalI* Verdau des Plasmids pSK-GK isoliert und *Asp718/SalI* in das Plasmid pB33Hyg cloniert. Hieraus resultierte das Plasmid pB33Hyg-GK, welches für die Transforma-

tion der transgenen Kartoffellinie U-Inv-2 (Linie 30) eingesetzt wurde.

Zur Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* wird das binäre Plasmid durch direkte Transformation nach der Methode von Höfgen & Willmitzer (Nucl. Acids Res. 16 (1988), 9877) in die Zellen eingeführt. Die Plasmid-DNA transformierter Agrobakterien wurde nach der Methode von Birnboim et al. (Nucl. Acids Res. 7 (1979), 1513-1523) isoliert und nach geeigneter Restriktionsspaltung gelelektrophoretisch analysiert. Zur Transformation von Kartoffelpflanzen werden beispielsweise 10 kleine, mit einem Skalpell verwundete Blätter einer Sterilkultur in 10 ml MS-Medium mit 2 % (Gew./Vol.) Saccharose gelegt, welches 30 bis 50 µl einer unter Selektion gewachsenen *Agrobacterium tumefaciens*-Übernachtskultur enthält. Nach 3 bis 5-minütigem, leichtem Schütteln werden die Petrischalen bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Nach 2 Tagen werden die Blätter auf MS-Medium mit 1,6 % (Gew./Vol.) Glucose, 2 mg/l Zeatinribose, 0,02 mg/l Naphthylessigsäure, 0,02 mg/l Giberellinsäure, 500 mg/l Claforan, 3 mg/l Hygromycin und 0,8 % Bacto-Agar ausgelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei 25°C und 3000 Lux wird die Claforankonzentration im Medium um die Hälfte reduziert. Die weitere Kultivierung erfolgte wie von Rocha-Sosa et al. (EMBO J. 8 (1989), 23-29) beschrieben.

### Beispiel 3

#### Analyse von transgenen Kartoffelpflanzen die eine Invertase aus Hefe und eine Glucokinase aus *Zymomonas mobilis* in Knollen exprimieren

Regenerierte Kartoffelpflanzen der Linie U-Inv-2 (30), die mit dem binären Konstrukt pB33Hyg-GK transformiert worden sind, wurden in Erde transferiert und bezüglich der Glucokinaseaktivität in Knollen selektiert. Dabei wurden mehrere Genotypen identifiziert, die eine bis zu fünffach erhöhte Glucokinaseaktivität, verglichen mit den Kontrollpflanzen,

aufweisen (z.B. GK-41, GK-29, GK-38). Des weiteren wurde nachgewiesen, daß diese Genotypen weiterhin das Invertasegen aus Hefe exprimieren (vgl. Tabelle I).

Tabelle I

Pflanze	Invertaseaktivität (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> Protein)	Glucokinaseaktivität (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> Protein)
Kontrolle	9 ± 1	11 ± 2
U-Inv-2	1027 ± 44	18 ± 2
GK-41	n.d.	43 ± 5
GK-29	n.d.	45 ± 5
GK-38	1132 ± 232	55 ± 13

Die hier dargestellten Enzymaktivitäten sind der Mittelwert von mindestens fünf Messungen ausgehend von fünf unabhängigen Pflanzen.

Die oben genannten Genotypen GK-41, GK-29 und GK-38 wurden amplifiziert, und jeweils 15 Pflanzen wurden in ein Gewächshaus transferiert. Die Ernte der Knollen erfolgte 4 Monate später.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß die Knollen der transgenen Pflanzen GK-41, GK-29 und GK-38 nur noch 40 bis 60 % der Stärkemenge von Kontrollpflanzen enthalten, wobei aber der stärkefreie Anteil an Trockensubstanz konstant bleibt (vgl. Tabelle II). Dies zeigt, daß ausschließlich der Stärkeanteil in den Knollen der GK-Pflanzen durch die Expression der Invertase in Kombination mit der Expression der Glucokinase reduziert ist. Es wurde des weiteren eine Ertragsdepression um 25 % festgestellt. Dies korreliert wiederum mit der Reduktion des Stärkeanteiles.

Tabelle II

Pflanze	Ertrag pro Pflanze	Spezifisches Gewicht	% Stärke	% Trockensubstanz
Kontrolle	191 g	1,091	16,1	22,5
U-Inv-2	147 g	1,074	12,7	18,9
GK-41	139 g	1,064	10,7	16,8
GK-29	135 g	1,058	9,5	15,5
GK-41	137 g	1,046	7,1	13,4

Die Analyse von löslichen Zuckern wie Glucose, Fructose und Saccharose ergab erstaunlicherweise, daß der siebenfache Anstieg der Glucosekonzentration in den U-Inv-2 Pflanzen verglichen mit dem Wildtyp durch die Expression der Glucokinase stark reduziert wird, so daß die Glucosemenge nur noch 30 % der Glucosemenge in Knollen von WT-Kontrollpflanzen beträgt. Die Fructosekonzentration ist in den transgenen Linien gegenüber den Kontrollpflanzen nicht verändert. Die starke Reduktion der Saccharosemenge in den U-Inv-2 Pflanzen wird durch die Expression der Glucokinase zum Teil aufgehoben (vgl. Tabelle III). Zusammenfassend wurde festgestellt, daß z.B. die Knollen der GK-38 Pflanzen nur noch 40 % Stärke und 50 % lösliche Zucker verglichen mit Knollen von untransformierten Kontrollpflanzen enthalten.

Tabelle III

Pflanze	Glucose	Fructose	Saccharose
	in $\mu\text{mol g}^{-1}$ Frischgewicht		
Kontrolle	3,5 $\pm$ 2,2	0,9 $\pm$ 0,2	12,0 $\pm$ 1,0
U-Inv-2	25,7 $\pm$ 3,1	0,6 $\pm$ 0,3	0,7 $\pm$ 0,4
GK-38	1,0 $\pm$ 0,7	0,2 $\pm$ 0,1	6,3 $\pm$ 1,4

Da es keinerlei Hinweise gibt, daß die Menge an Photoassimilaten, die über das Phloem aus den maturen Blättern in die Knollen transportiert wird, in den GK-Pflanzen reduziert ist, da aber andererseits reduzierte Gehalte an Stärke und

löslichen Zuckern gemessen werden, ist davon auszugehen, daß die Expression einer Invertase im Cytosol von Pflanzenzellen in Kombination mit der Expression einer Glucokinase in Cytosol von Pflanzenzellen zu einer Steigerung der Glykolyse und der Respiration führt.

Dieses überraschende Ergebnis wird durch veränderte Gehalte an Metaboliten und veränderte Enzymaktivitäten in Knollenextrakten der GK-Pflanzen unterstrichen. Es wurde eine bis zu fünffache Erhöhung des Glucose-6-Phosphatgehaltes, eine bis zu fünffache Erhöhung des Fructose-6-Phosphatgehaltes, eine ca. 40%ige Steigerung des 3-Phosphoglyceratgehaltes, eine etwa sechsfache Zunahme des Pyruvatgehaltes und eine bis zu 50%ige Steigerung des ATP-Gehaltes nachgewiesen (vgl. Tabelle IV).

Tabelle IV

Metabolit	Kontrolle	U-Inv-2	GK-38
Glucose-6-Phosphat	107±15	343±19	513±56
Glucose-1-Phosphat	13±1	25±2	17±4
Fructose-6-Phosphat	29±5	100±6	153±19
UDP-Glucose	126±12	91±11	107±4
3-Phosphoglycerat	92±18	127±22	135±35
Phosphoenolpyruvat	33±4	34±8	37±11
Pyruvat	15±3	27±5	84±23
ATP	32±2	27±7	45±7
ADP	24±2	25±4	28±2

Die hier dargestellten Metabolitmengen sind der Mittelwert von mindestens fünf Messungen ausgehend von fünf unabhängigen Pflanzen. Die Werte sind in nmol g<sup>-1</sup> Frischgewicht angegeben.

Des weiteren wurde gezeigt, daß die Aktivität von Enzymen, welche Reaktionen der Glykolyse katalysieren, in Knollenextrakten der GK-Pflanzen erhöht ist (vgl. Tabelle V).

Es sind z.B. die spezifischen Aktivitäten der Fructokinase, der Phosphofructokinase, der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH) und der Pyruvatkinase erhöht.

Die Expression einer Invertase im Cytosol von Pflanzenzellen in Kombination mit der Expression einer Glucokinase im Cytosol von Pflanzenzellen stellt also ein Verfahren dar, welches zu einer Steigerung von Glykolyse und Respiration führt.

Tabelle V

Enzym	Kontrolle	U-Inv-2	GK-38
Saccharosesynthase	41±5	15±4	236±85
Fructokinase	52±2	90±7	88±5
Phosphoglucomutase	1635±150	1354±79	1408±24
Phosphofructokinase	54±4	89±7	98±4
GAP-DH	942±56	1791±190	1926±145
Phosphoglyceratkinase	883±83	962±78	901±22
Phosphoglyceratmutase	539±68	553±19	615±21
Pyruvatkinase	532±42	551±29	688±33

Die hier dargestellten Enzymaktivitäten sind der Mittelwert von mindestens fünf Messungen ausgehend von fünf unabhängigen Pflanzen. Die Werte sind in  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  Frischgewicht angegeben.

#### Beispiel 4

##### Bestimmung des Gasaustausches von Knollen

Die  $\text{CO}_2$ -Produktion wurde bei noch wachsenden Knollen (Tabelle VI) bestimmt.

Tabelle VI

	Kontrolle	U-Inv-2	GK-38
CO <sub>2</sub>	18±2,0	58±7,0	84±6,0

Die hier dargestellten Werte sind die Mittelwerte von sechs Messungen ausgehend von sechs unabhängigen Pflanzen. Die Werte sind in mmol CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> Frischgewicht angegeben.

Die in Tabelle VI angegebenen Daten zeigen, daß die Produktion des Kohlendioxids in den U-Inv-2-Pflanzen um den Faktor 3 und in den GK-Pflanzen um den Faktor 5 erhöht ist.

Dieses überraschende Ergebnis bedeutet, daß die Expression einer Invertase im Cytosol in Kombination mit der Expression einer Glucokinase ein Verfahren darstellt, welches zu einer Steigerung der Glykolyse und der Respiration in pflanzlichen Zellen führt.

Die in den oben beschriebenen Experimenten angegebenen Kontrollen sind jeweils nicht-transformierte Pflanzen der Pflanzenart bzw. Unterart, die für die Transformation verwendet wurde.



P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Transgene Pflanzenzelle mit einer im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzenzellen gesteigerten Glykolyserate, bei der es aufgrund der Einführung und Expression von DNA-Sequenzen, die eine cytosolische Invertase codieren, sowie von DNA-Sequenzen, die eine cytosolischen Hexokinase codieren, zu einer Erhöhung der Invertase- und Hexokinaseaktivität kommt.
2. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 1, wobei die Invertase ein dereguliertes Enzym ist.
3. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 1, wobei die Invertase ein unreguliertes Enzym ist.
4. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Hexokinase ein dereguliertes Enzym ist.
5. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Hexokinase ein unreguliertes Enzym ist.
6. Transgene Pflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Hexokinase eine Glucokinase ist.
7. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die die Invertase codierende DNA-Sequenz eine Invertase eines Pilzes codiert.
8. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 7, wobei die Invertase eine Invertase aus *Saccharomyces cerevisiae* ist.
9. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 8, wobei die DNA-Sequenz, die die Invertase codiert, das Suc2-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* ist.

10. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Hexokinase eine Hexokinase aus einem prokaryontischen Organismus ist.
11. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 10, wobei die Hexokinase eine Glucokinase aus *Zymomonas mobilis* ist.
12. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die DNA-Sequenz, die die Invertase codiert, unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors, eines Promotors, der zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt der Pflanze aktiv ist, oder eines Promotors, der durch äußere Faktoren induzierbar ist, steht.
13. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die DNA-Sequenz, die die Hexokinase codiert, unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors, eines Promotors, der zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt der Pflanze aktiv ist, oder eines Promotors, der durch äußere Faktoren induzierbar ist, steht.
14. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 13, die eine Zelle einer Nutzpflanze ist.
15. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 14, die eine Zelle einer ölspeichernden Pflanze ist.
16. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 15, die eine Zelle einer Raps-, Sojabohnen-, Sonnenblumen- oder Ölpalmenpflanze ist.
17. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 14, die eine Zelle einer stärkespeichernden Pflanze ist.
18. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 17, die eine Zelle einer Mais-, Reis-, Weizen-, Gersten-, Roggen-, Hafer- oder Kartoffelpflanze ist.

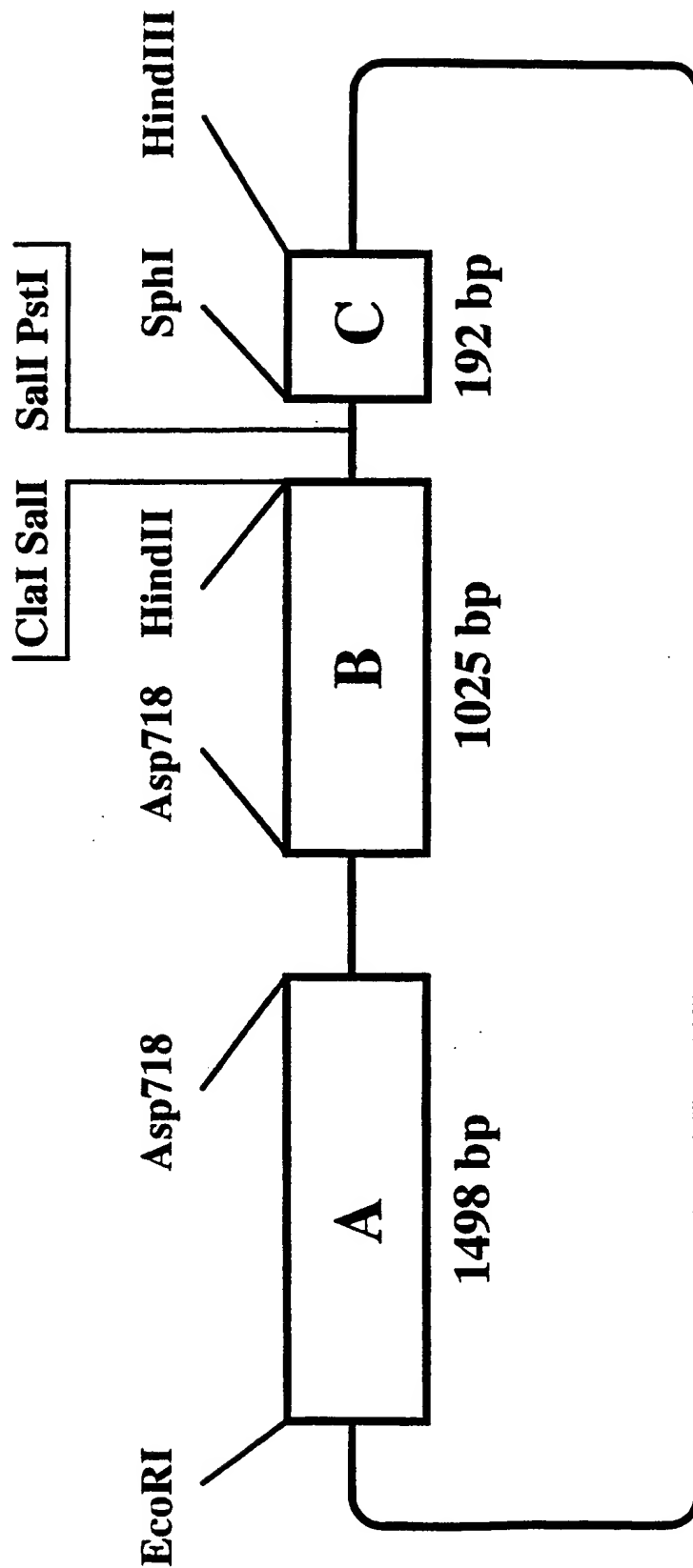
19. Transgene Pflanze erhältlich durch Regeneration einer Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 18.
20. Transgene Pflanze enthaltend Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 18.
21. Transgene Pflanze nach Anspruch 19 oder 20, bei der aufgrund der Steigerung der Glykolyserate in Geleitzellen die Transportrate von Photoassimilaten erhöht ist.
22. Transgene Pflanze nach einem der Ansprüche 19 bis 21, bei der aufgrund der Steigerung der Glykolyserate in Zellen der Wurzelepidermis oder der Wurzelhaare die Aufnahme von Mineralien aus dem Boden erhöht ist.
23. Transgene Pflanze nach einem der Ansprüche 19 bis 22, bei der aufgrund der gesteigerten Glykolyserate im Endosperm und/oder in den Cotyledonen von Samen die Fettsäurebiosynthese erhöht ist.
24. Transgene Pflanze nach einem der Ansprüche 19 bis 23, bei der aufgrund der gesteigerten Glykolyserate in einem Organ der Fettsäuregehalt erhöht ist bei gleichzeitiger Verringerung des Stärkegehaltes.
25. Vermehrungsmaterial einer Pflanze nach einem der Ansprüche 19 bis 24, enthaltend transgene Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 18.
26. Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzenzellen mit gesteigerter Glykolyserate, bei dem in pflanzliche Zellen DNA-Sequenzen eingebracht werden, die eine cytosolische Invertase codieren, sowie DNA-Sequenzen, die eine cytosolische Hexokinase codieren, und diese DNA-Sequenzen in den transformierten Pflanzenzellen exprimiert werden.

27. Verfahren nach Anspruch 26, wobei die Invertase ein dereguliertes oder unreguliertes Enzym ist.
28. Verfahren nach Anspruch 26 oder 27, wobei die Hexokinase ein dereguliertes oder unreguliertes Enzym ist.
29. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 28, wobei die Hexokinase eine Glucokinase ist.
30. Rekombinantes DNA-Molekül enthaltend folgende DNA-Sequenzen:
  - (i) eine DNA-Sequenz, die eine cytosolische Invertase codiert, in Kombination mit DNA-Sequenzen, die die Transkription und Translation in pflanzlichen Zellen gewährleisten; und
  - (ii) eine DNA-Sequenz, die eine cytosolische Hexokinase codiert, in Kombination mit DNA-Sequenzen, die die Transkription und Translation in pflanzlichen Zellen gewährleisten.
31. Rekombinantes DNA-Molekül enthaltend eine DNA-Sequenz, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Hexokinase codiert, in Kombination mit DNA-Sequenzen, die die Transkription und Translation in pflanzlichen Zellen gewährleisten.
32. Rekombinantes DNA-Molekül nach Anspruch 30 oder 31, wobei die Hexokinase eine Glucokinase ist.
33. Verwendung von DNA-Sequenzen, die eine Invertase codieren, zur Herstellung von transgenen Pflanzenzellen, die im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzenzellen eine gesteigerte Glycolyserate aufweisen.
34. Verwendung von DNA-Sequenzen, die eine Hexokinase codieren, zur Herstellung von transgenen Pflanzenzellen,

die im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzenzellen eine gesteigerte Glykolyserate aufweisen.

35. Verwendung nach Anspruch 33, wobei die Hexokinase eine Glucokinase ist.

1/1



**Plasmid pB33Hyg-GK 12,68 kb**

**Fig. 1**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 96/03514

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/82 C12N15/54 C12N15/55 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	THE PLANT CELL, vol. 6, November 1994, pages 1665-1679, XP002020817 JANG, J.C., ET AL.: "Sugar sensing in higer plants" see page 1675, left-hand column, last paragraph - right-hand column ---	31
X	WO,A,94 28149 (MONSANTO CO ;BARRY GERARD FRANCIS (US); KISHORE GANESH MURTHY (US)) 8 December 1994 see page 5, line 28 - line 35 --- -/--	31

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 December 1996

Date of mailing of the international search report

07. 01. 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, SAN ANTONIO, TEXAS, USA, JULY 27-31, 1996. PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE) 111 (2 SUPPL.). 1996. 169., XP002020818 TRETHERWEY R ET AL: "Glucokinase activity in potato tubers: A key step for the regulation of metabolism." see abstract 798 ---	1-14, 17-20, 26-29, 31-35
P,X	WO,A,96 17069 (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG ;KOSSMANN JENS (DE); SPRINGER FRANZI) 6 June 1996 see page 6, paragraph 7 see page 9, last paragraph; claims 9,17 ---	31,32
A	EP,A,0 442 592 (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG) 21 August 1991 see the whole document ---	1-35
A	EP,A,0 438 904 (CAMBRIDGE ADVANCED TECH) 31 July 1991 see the whole document ---	1-35
A	THE PLANT JOURNAL, vol. 1, no. 1, 1991, pages 95-106, XP002020819 SONNEWALD, ET AL.: "Transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in either the cytosol, vacuole or apoplast: a powerful tool for studying sucrose metabolism and sink/source interactions" see page 104, left-hand column ---	1-35
A	PLANTA, vol. 194, 1994, pages 95-101, XP002020820 BURRELL, M.M., ET AL.: "Genetic manipulation of 6-phosphofructokinase in potato tubers" see the whole document ---	26
A	PLANTA, vol. 192, 1994, pages 16-30, XP002020821 HAJIREZAEI, M., ET AL.: "Transgenic potato plants with strongly decreased expression of pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphotransferase show no visible phenotype and only minor changes in metabolic fluxes in their tubers" see the whole document ---	26
	--- -/--	



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 96/03514

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO,A,95 05457 (JAPAN TOBACCO INC ;HIYOSHI TORU (JP); MINE TOSHIKI (JP); KASAOKA K)  23 February 1995  see the whole document  &amp; EP,A,0 677 581 (JAPAN TOBACCO) 18  October 1995  see page 5, line 5 - line 14  -----</p>	26

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 96/03514

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO-A-9428149	08-12-94	AU-A-	6947394	20-12-94
		CA-A-	2162383	08-12-94
		CN-A-	1127016	17-07-96
		EP-A-	0701618	20-03-96
		HU-A-	73468	28-08-96
		PL-A-	311755	18-03-96
-----				
WO-A-9617069	06-06-96	DE-A-	4444460	30-05-96
		AU-A-	4177096	19-06-96
-----				
EP-A-0442592	21-08-91	DE-A-	4004800	14-08-91
		AU-B-	650639	30-06-94
		AU-A-	7089891	15-08-91
		CA-A-	2036103	14-08-91
		JP-A-	5049482	02-03-93
		US-A-	5436394	25-07-95
-----				
EP-A-0438904	31-07-91	AU-A-	6836590	04-07-91
		JP-A-	4341126	27-11-92
		US-A-	5387756	07-02-95
-----				
WO-A-9505457	23-02-95	CA-A-	2147355	23-02-95
		EP-A-	0677581	18-10-95
-----				

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12N15/82 C12N15/54 C12N15/55 A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 C12N A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	THE PLANT CELL, Bd. 6, November 1994, Seiten 1665-1679, XP002020817 JANG, J.C., ET AL.: "Sugar sensing in higer plants" siehe Seite 1675, linke Spalte, letzter Absatz - rechte Spalte ---	31
X	WO,A,94 28149 (MONSANTO CO ;BARRY GERARD FRANCIS (US); KISHORE GANESH MURTHY (US)) 8.Dezember 1994 siehe Seite 5, Zeile 28 - Zeile 35 --- -/--	31

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\* "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\* "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\* "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\* "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\* "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\* "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\* "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\* "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\* "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11.Dezember 1996

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

07.01.97

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Maddox, A

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, SAN ANTONIO, TEXAS, USA, JULY 27-31, 1996. PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE) 111 (2 SUPPL.). 1996. 169., XP002020818 TRETHEWEY R ET AL: "Glucokinase activity in potato tubers: A key step for the regulation of metabolism." see abstract 798 ---	1-14, 17-20, 26-29, 31-35
P,X	WO,A,96 17069 (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG ;KOSSMANN JENS (DE); SPRINGER FRANZI) 6.Juni 1996 siehe Seite 6, Absatz 7 siehe Seite 9, letzter Absatz; Ansprüche 9,17 ---	31,32
A	EP,A,0 442 592 (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG) 21.August 1991 siehe das ganze Dokument ---	1-35
A	EP,A,0 438 904 (CAMBRIDGE ADVANCED TECH) 31.Juli 1991 siehe das ganze Dokument ---	1-35
A	THE PLANT JOURNAL, Bd. 1, Nr. 1, 1991, Seiten 95-106, XP002020819 SONNEWALD, ET AL.: "Transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in either the cytosol, vacuole or apoplast: a powerful tool for studying sucrose metabolism and sink/source interactions" siehe Seite 104, linke Spalte ---	1-35
A	PLANTA, Bd. 194, 1994, Seiten 95-101, XP002020820 BURRELL, M.M., ET AL.: "Genetic manipulation of 6-phosphofructokinase in potato tubers" siehe das ganze Dokument ---	26
A	PLANTA, Bd. 192, 1994, Seiten 16-30, XP002020821 HAJIREZAEI, M., ET AL.: "Transgenic potato plants with strongly decreased expression of pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphotransferase show no visible phenotype and only minor changes in metabolic fluxes in their tubers" siehe das ganze Dokument ---	26
	--- -/--	

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO,A,95 05457 (JAPAN TOBACCO INC ;HIYOSHI TORU (JP); MINE TOSHIKI (JP); KASAOKA K) 23.Februar 1995 siehe das ganze Dokument & EP,A,0 677 581 (JAPAN TOBACCO) 18.Oktober 1995 siehe Seite 5, Zeile 5 - Zeile 14 -----	26

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO-A-9428149	08-12-94	AU-A-	6947394	20-12-94
		CA-A-	2162383	08-12-94
		CN-A-	1127016	17-07-96
		EP-A-	0701618	20-03-96
		HU-A-	73468	28-08-96
		PL-A-	311755	18-03-96
-----				
WO-A-9617069	06-06-96	DE-A-	4444460	30-05-96
		AU-A-	4177096	19-06-96
-----				
EP-A-0442592	21-08-91	DE-A-	4004800	14-08-91
		AU-B-	650639	30-06-94
		AU-A-	7089891	15-08-91
		CA-A-	2036103	14-08-91
		JP-A-	5049482	02-03-93
		US-A-	5436394	25-07-95
-----				
EP-A-0438904	31-07-91	AU-A-	6836590	04-07-91
		JP-A-	4341126	27-11-92
		US-A-	5387756	07-02-95
-----				
WO-A-9505457	23-02-95	CA-A-	2147355	23-02-95
		EP-A-	0677581	18-10-95
-----				